

N° d'Enregistrement

au C.N.R.S.

A.O. 5400

ARTICLE PRINCIPAL

Recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

de PARIS

par

Mademoiselle Martine CANIVET

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse: INTERFERON ET VIRUS DU GROUPE LEUCEMIES -SARCOMES DE LA SOURIS

Soutenue le 25 Février 1971, devant la Commission d'Examen:

MM. A. THOMAS Président

A. HOLLANDE

J. BERNARD Examineurs

M. BOIRON

COLLOQUES INTERNATIONAUX
DU
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

N° 183

DÉFECTIVITÉ, DÉMASQUAGE ET STIMULATION DES VIRUS ONCOGÈNES

Deuxième Colloque International sur les Virus Oncogènes

ROYAUMONT

3-5 Juin 1969

Organisé par

M. BOIRON, J. PERIES, J. C. CHUAT

Institut de Recherches sur les Leucémies,
Hôpital St-Louis - PARIS

C. CHANY, I. GRESSER

Institut de Recherches sur le Cancer,
VILLEJUIF

EXTRAIT

ÉDITIONS DU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

15, quai Anatole-France - Paris - VII^e

1970

COLLOQUE INTERNATIONAL
DU
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

N° 183

ÉDITIONS DU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

DÉMASQUAGE ET STIMULATION DES VIRUS ONCOGÈNES

Deuxième Colloque International sur les Virus Oncogènes

ROYAUMONT
3-5 Juin 1963



Organisé par

C. CHANY & G. GRESSER
Institut de Recherches sur le Cancer
Villeurbanne

M. ROIRON, J. PIERRE & C. CHAT
Institut de Recherches sur les Leucémies
Hôpital St Louis - Paris

EXTRAIT

ÉDITIONS DU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

15, rue Assolins-Paris - 75014-Paris

1970

ETUDE DU PHÉNOMÈNE DE PERTE DE SENSIBILITÉ A L'INTERFERON DES CELLULES INFECTÉES PAR LES VIRUS DU GROUPE « LEUCÉMIES-SARCOMES » MURINS

M. CANIVET, J. PERIES et M. BOIRON*

Laboratoire d'Hématologie Expérimentale,
Institut de Recherches sur les leucémies,
Hôpital Saint-Louis, Paris (X*)

RÉSUMÉ

Des cellules infectées par les virus leucémogènes murins de Rauscher et de Moloney et le virus du sarcome murin, souche Moloney (VSM) perdent leur sensibilité à l'action protectrice d'un interféron exogène. Ce phénomène étudié plus spécialement dans le cas de cellules infectées par le VSM, semble lié à un événement précoce du cycle viral qui interfère avec le mécanisme protecteur de l'interféron au stade de l'inhibition de la traduction des messages viraux.

Au cours d'essais de propagation in vitro des virus leucémogènes et sarcomatogènes murins, nous avons constaté que les cellules infectées perdaient leur sensibilité vis à vis de l'action protectrice d'un interféron exogène. Chany et Robbe-Maridor ont obtenu des résultats similaires dans un système de fibroblastes de souris infectés par un virus du même groupe [1].

Matériel et méthodes

Les préparations d'interféron utilisées ont été obtenues chez la souris par la méthode de Finter [2] et titrées selon une méthode déjà décrite [3]. Les titres variaient de 1 280 à 2 560 unités par ml. Ces préparations répondaient aux critères généralement requis pour affirmer la présence d'un interféron : action inhibitrice contre différents virus (stomatite vésiculaire (VSV), vaccine, virus de l'encéphalomyocardite de la souris), spécificité cellulaire, sensibilité à la trypsine, solubilité après centrifugation à 80 000 g

pendant 2 heures, résistance à pH 2.0, mécanisme d'action intracellulaire.

Les cellules éprouvées comprenaient : (a) des cellules normales, non infectées, de souris : fibroblastes embryonnaires de souris Swiss (FESS) préparés selon les techniques habituelles; lignée JLSV6, dérivée de rate et de thymus de souris BALB/c normale [4]; (b) des FESS récemment infectés avec le virus de la leucémie de Rauscher (VR) ou le virus du sarcome murin (VSM, souche Moloney); (c) des cellules provenant de lignées continues chroniquement infectées par les virus du groupe « leucémies-sarcomes » murins : lignée JLSV5, dérivée de la lignée JLSV6 après infection de celle-ci par le VR [4]; lignée JLSV 11 chroniquement infectée par le virus de la leucémie de Moloney (VM) [5]; lignée ELI [6], provenant de fibroblastes embryonnaires de souris BALB/c infectés avec le VSM.

L'appréciation de la sensibilité cellulaire à l'action protectrice de l'interféron a été faite après trypsination des cellules et culture en tubes de Kahn, par

(*) Avec la collaboration de M^{me} Madeleine Olivé.

adjonction pendant 18 h à 37 °C de dilutions à base 2 de préparations d'interféron sous un volume de 1 ml. Après lavage, les cellules ont été soumises à l'action de 100 DECP/50 de VSV, préparé et titré selon une technique déjà publiée [3]. La lecture de l'effet cytopathogène a été effectuée 4 jours après, et la dilution d'interféron protégeant 100 % des cellules a été déterminée. L'inverse de cette dilution exprime le titre d'interféron trouvé dans ces conditions et par conséquent la sensibilité cellulaire à l'action de cette substance.

Une différence de 2 dilutions dans les titres obtenus a été établie comme le seuil de signification.

Mise en évidence du phénomène

1) Pouvoir protecteur des préparations d'interféron sur cellules de souris normales ou chroniquement infectées par les virus du groupe « leucémies-sarcomes » murin.

Les résultats figurent sur le tableau 1. Sur cellules normales (explant primaire ou lignée), le titre d'inter-

TABLEAU 1

Pouvoir protecteur de préparations d'interféron sur cellules de souris normales ou chroniquement infectées par les virus du groupe « Leucémies-sarcomes murins »

Expérience	Type cellulaire	Titre de l'interféron
1	JLSV 6	640
	FESS(*)	640
	JLSV 5	< 20
	JLSV 11	< 20
2	JLSV 6	2 560
	FESS	1 280
	JLSV 5	80
	JLSV 11	
3	JLSV 6	1 280
	FESS	1 280
	JLSV 5	< 20
	JLSV 11	< 20

* Fibroblastes embryonnaires de souris Swiss.

féron varie, selon les expériences, de 640 à 2 560. Par contre, sur les cellules provenant de lignées chroniquement infectées par le VR, le VM, le VSM, les titres des mêmes préparations d'interféron sont très bas, inférieurs généralement à 20.

2) Pouvoir protecteur des préparations d'interféron sur cellules de souris normales ou récemment infectées par le VR.

Des FESS normaux et infectés par le virus de Rauscher ont été cultivés et passés parallèlement. A chaque passage, le pouvoir protecteur d'une même préparation d'interféron a été éprouvé sur les 2 séries. Les résultats figurent sur le tableau 2 et montrent que

TABLEAU 2

Pouvoir protecteur de préparations d'interféron sur cellules de souris normales ou récemment infectées par le virus de Rauscher

Passage	Type cellulaire	Titre de l'interféron
1	FESS inoculés avec VR	1 280
	FESS témoins	1 280
2	FESS inoculés avec VR	160
	FESS témoins	1 280
3	FESS inoculés avec VR	< 20
	FESS témoins	1 280

la perte de sensibilité à l'interféron des cellules infectées n'apparaît qu'au 2^e passage et ne devient très franche qu'au 3^e passage.

3) Pouvoir protecteur des préparations d'interféron sur cellules de souris normales ou récemment infectées par le VSM.

Des FESS ont été infectés par le VSM; 48 h après l'infection, alors qu'un aspect de « conversion » globale était obtenu, un même lot d'interféron a été titré parallèlement sur ces cellules et sur des cellules normales témoins. Les résultats figurent sur le tableau 3 et démontrent que les cellules infectées ne sont pas protégées par des préparations d'interféron.

TABLEAU 3

Pouvoir protecteur de préparations d'interféron sur cellules de souris normales ou converties par le virus du sarcome murin

Expérience	Cellules embryonnaires de souris Swiss	Titre de l'interféron
1	converties	0
	témoins	1 280
2	converties	0
	témoins	1 280
3	converties	0
	témoins	1 280

Étude du mécanisme d'action

Afin d'étudier le mécanisme de ce phénomène, nous avons utilisé comme inducteur de la P.S.I. le V.S.M. Le choix de ce virus est dicté par sa remarquable efficacité d'infection *in vitro* et par le fait qu'il provoque une conversion morphologique des cellules, qui visualise de façon simple et objective l'infection virale [7].

1) Spécificité de la P.S.I.

Il existe un lien spécifique entre l'infection par le V.S.M. et la P.S.I. : les facteurs physico-chimiques d'inhibition du V.S.M. (radiations ultraviolettes, température) inhibent parallèlement la P.S.I.; il existe une relation linéaire entre les dilutions de V.S.M. inoculé aux cellules et l'intensité du phénomène; enfin un sérum anti V.S.M. préparé chez le lapin bloque à la fois la P.S.I. et la conversion morphologique induites par le V.S.M., tandis que le sérum du même lapin prélevé avant immunisation n'a aucun effet.

2) Effet du type de virus de surcharge utilisé.

Dans nos premières expériences, nous avons employé exclusivement, comme virus de surcharge, celui de la stomatite vésiculaire (V.S.V.). Nous avons employé ensuite un virus ADN, le virus vaccinal et

deux autres virus ARN, le virus de Sindbis et celui de l'encéphalomyocardite de la souris (E.M.C.). La P.S.I. se manifeste dans tous les cas, ce qui suggère qu'il s'agit d'une réponse d'ordre général non liée au type de virus de surcharge utilisé.

3) Etude du taux de croissance des cellules infectées par le V.S.M.

Il a été suggéré [8] que la durée de l'état de protection dû à l'interféron est en rapport avec le taux de croissance cellulaire; la protection disparaîtrait lorsque la cellule se divise. La P.S.I. étant évaluée par des titrations comparatives sur des cellules infectées et non infectées, il était important de vérifier que les premières ne présentaient pas un taux de croissance supérieur à celui des secondes.

Des numérations cellulaires successives, à partir de la mise en culture et pendant un laps de temps correspondant à la durée des expériences, ont permis de constater que les cellules infectées et non infectées présentaient la même courbe de multiplication. La P.S.I. ne dépend pas d'une accélération du taux de croissance des cellules infectées.

4) Etude du taux des synthèses protéiques dans les cellules infectées par le V.S.M.

Le mécanisme d'action de l'interféron comporterait la néosynthèse d'une protéine inhibitrice de la traduction (P.I.T.) de l'acide nucléique viral [9, 10, 11]. Il nous a paru donc nécessaire de vérifier qu'il n'existait pas un arrêt ou une diminution notable des synthèses protéiques dans les cellules infectées par le V.S.M. L'incorporation d'un acide aminé marqué (³H-leucine) a permis de constater qu'il n'existe pas de différences significatives de la synthèse protéique dans les cellules infectées et les cellules témoins.

5) Multiplication du V.S.V. sur des cellules infectées par le V.S.M.

Le V.S.V. ayant été choisi comme virus de surcharge dans la majorité des expériences, il a paru important de savoir si la pousse du V.S.V. était comparable sur des cellules infectées et non infectées par le V.S.M. Nous avons étudié, en évaluant la quantité de virus produite par cellule et par des expé-

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Expériences	de source 2e	de source 1e
1	1200	1200
2	1200	1200
3	1200	1200

riences de multiplication en cycle unique, la répliation du V.S.V. dans les deux systèmes cellulaires.

Les résultats obtenus montrent que le nombre d'unités infectieuses produit par cellule dans des cultures infectées et non infectées est pratiquement identique. Par ailleurs, les courbes de multiplication en cycle unique sont quantitativement et qualitativement du même type.

Des résultats similaires sont obtenus quand on étudie par les mêmes techniques le virus de la vaccine et le virus E.M.C.

6) Recherche d'une substance anti-interféron dans les cultures cellulaires infectées par le V.S.M.

Des travaux publiés récemment [9, 10, 11] ont montré l'existence de substances anti-interféron induites au cours de l'infection virale. Nous avons essayé de mettre en évidence une éventuelle substance de ce type dans le système virus-cellules que nous étudions. Jusqu'à présent l'application des techniques décrites dans ces travaux ne nous a pas permis d'obtenir des résultats positifs.

7) Moment d'apparition de la P.S.I. au cours du cycle V.S.M.

Le phénomène commence à se manifester 3 h après l'infection et devient total à partir de 8 h. Ce fait démontre que le mécanisme de la P.S.I. est lié à un événement précoce du cycle viral.

8) Mode d'activation du V.S.M. sur le mécanisme protecteur de l'interféron.

Les travaux de Marcus [12], de Jocklik [13] et de Lévy [14] suggèrent que la pénétration dans la cellule d'une faible quantité d'interféron déclencherait, au niveau du génome cellulaire, une dérépression permettant la synthèse d'un ARN messager (ARN-m) codant pour une protéine nouvelle, inhibitrice de la traduction des messages contenus dans les ARN-m viraux. Il nous a semblé intéressant d'étudier à quel niveau de ce mécanisme prend place l'action anti-interféron du V.S.M. Dans ce but nous avons effectué l'expérience suivante : des tubes de fibroblastes de souris ont été traités pendant 8 h avec de l'inter-

féron; ce temps écoulé, ils ont été lavés soigneusement avec du milieu et répartis en deux séries. Les premiers ont été inoculés avec le V.S.M.; les seconds ont reçu du milieu. Vingt quatre heures après l'inoculation du virus, les tubes ont été surchargés avec 200 DECP/50 de V.S.V. Les titres d'interféron ont été évalués selon la méthode déjà décrite.

Nous avons constaté une chute à 0 du titre d'interféron dans la série inoculée avec le V.S.M. tandis que le titre était de 640/ml dans la série témoin.

Cette expérience démontre que le V.S.M. agit au stade de l'inhibition de la traduction des messages viraux, et non sur les stades antérieurs tels que la pénétration de l'interféron dans les cellules, la dérépression du génome cellulaire ou la synthèse de l'ARN-m spécifique de la P.I.T.

En effet, après 8 h d'action de l'interféron, les différentes étapes du mécanisme d'action de l'interféron ont été franchies jusqu'à la synthèse de la P.I.T. dont le taux maximal de production a déjà été atteint [15].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CHANY C. et ROBBE-MARIDOR F. (1968). — *C. R. Acad. Sci.*, 266, 1339.
- [2] FINTER N. B. (1964). — *Nature*, 204, 1114-1115.
- [3] PERIES J., BOIRON M. et CANIVET M. (1965). — *Ann. Inst. Pasteur*, 109, 595-600.
- [4] WRIGHT B. S. et LASFARGUES J. C. (1965). — *J.N.C.I.*, 35, 319-327.
- [5] WRIGHT B. S., O'BRIEN P. A., SHIBLEY G. P., MAYYASI S. A. et LASFARGUES J. C. (1967). *Cancer Res.*, 27, 1672-1677.
- [6] PERIES J. et CANIVET M. — Résultats non publiés.
- [7] BERNARD C., GUILLEMAIN B., PERIES J. et BOIRON M. (1968). — *Int. J. Cancer*, 2, 558.
- [8] SONNABEND J. A. et FRIEDMAN R. M. (1966). — *Interférons*, N. B. Finter North Holland Publ. Co. Amsterdam 206.
- [9] CHANY C. et BRAILOVSKY G. (1967). — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 57, 87.

100

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100. 101. 102. 103. 104. 105. 106. 107. 108. 109. 110. 111. 112. 113. 114. 115. 116. 117. 118. 119. 120. 121. 122. 123. 124. 125. 126. 127. 128. 129. 130. 131. 132. 133. 134. 135. 136. 137. 138. 139. 140. 141. 142. 143. 144. 145. 146. 147. 148. 149. 150. 151. 152. 153. 154. 155. 156. 157. 158. 159. 160. 161. 162. 163. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 175. 176. 177. 178. 179. 180. 181. 182. 183. 184. 185. 186. 187. 188. 189. 190. 191. 192. 193. 194. 195. 196. 197. 198. 199. 200. 201. 202. 203. 204. 205. 206. 207. 208. 209. 210. 211. 212. 213. 214. 215. 216. 217. 218. 219. 220. 221. 222. 223. 224. 225. 226. 227. 228. 229. 230. 231. 232. 233. 234. 235. 236. 237. 238. 239. 240. 241. 242. 243. 244. 245. 246. 247. 248. 249. 250. 251. 252. 253. 254. 255. 256. 257. 258. 259. 260. 261. 262. 263. 264. 265. 266. 267. 268. 269. 270. 271. 272. 273. 274. 275. 276. 277. 278. 279. 280. 281. 282. 283. 284. 285. 286. 287. 288. 289. 290. 291. 292. 293. 294. 295. 296. 297. 298. 299. 300. 301. 302. 303. 304. 305. 306. 307. 308. 309. 310. 311. 312. 313. 314. 315. 316. 317. 318. 319. 320. 321. 322. 323. 324. 325. 326. 327. 328. 329. 330. 331. 332. 333. 334. 335. 336. 337. 338. 339. 340. 341. 342. 343. 344. 345. 346. 347. 348. 349. 350. 351. 352. 353. 354. 355. 356. 357. 358. 359. 360. 361. 362. 363. 364. 365. 366. 367. 368. 369. 370. 371. 372. 373. 374. 375. 376. 377. 378. 379. 380. 381. 382. 383. 384. 385. 386. 387. 388. 389. 390. 391. 392. 393. 394. 395. 396. 397. 398. 399. 400. 401. 402. 403. 404. 405. 406. 407. 408. 409. 410. 411. 412. 413. 414. 415. 416. 417. 418. 419. 420. 421. 422. 423. 424. 425. 426. 427. 428. 429. 430. 431. 432. 433. 434. 435. 436. 437. 438. 439. 440. 441. 442. 443. 444. 445. 446. 447. 448. 449. 450. 451. 452. 453. 454. 455. 456. 457. 458. 459. 460. 461. 462. 463. 464. 465. 466. 467. 468. 469. 470. 471. 472. 473. 474. 475. 476. 477. 478. 479. 480. 481. 482. 483. 484. 485. 486. 487. 488. 489. 490. 491. 492. 493. 494. 495. 496. 497. 498. 499. 500. 501. 502. 503. 504. 505. 506. 507. 508. 509. 510. 511. 512. 513. 514. 515. 516. 517. 518. 519. 520. 521. 522. 523. 524. 525. 526. 527. 528. 529. 530. 531. 532. 533. 534. 535. 536. 537. 538. 539. 540. 541. 542. 543. 544. 545. 546. 547. 548. 549. 550. 551. 552. 553. 554. 555. 556. 557. 558. 559. 560. 561. 562. 563. 564. 565. 566. 567. 568. 569. 570. 571. 572. 573. 574. 575. 576. 577. 578. 579. 580. 581. 582. 583. 584. 585. 586. 587. 588. 589. 590. 591. 592. 593. 594. 595. 596. 597. 598. 599. 600. 601. 602. 603. 604. 605. 606. 607. 608. 609. 610. 611. 612. 613. 614. 615. 616. 617. 618. 619. 620. 621. 622. 623. 624. 625. 626. 627. 628. 629. 630. 631. 632. 633. 634. 635. 636. 637. 638. 639. 640. 641. 642. 643. 644. 645. 646. 647. 648. 649. 650. 651. 652. 653. 654. 655. 656. 657. 658. 659. 660. 661. 662. 663. 664. 665. 666. 667. 668. 669. 670. 671. 672. 673. 674. 675. 676. 677. 678. 679. 680. 681. 682. 683. 684. 685. 686. 687. 688. 689. 690. 691. 692. 693. 694. 695. 696. 697. 698. 699. 700. 701. 702. 703. 704. 705. 706. 707. 708. 709. 710. 711. 712. 713. 714. 715. 716. 717. 718. 719. 720. 721. 722. 723. 724. 725. 726. 727. 728. 729. 730. 731. 732. 733. 734. 735. 736. 737. 738. 739. 740. 741. 742. 743. 744. 745. 746. 747. 748. 749. 750. 751. 752. 753. 754. 755. 756. 757. 758. 759. 760. 761. 762. 763. 764. 765. 766. 767. 768. 769. 770. 771. 772. 773. 774. 775. 776. 777. 778. 779. 780. 781. 782. 783. 784. 785. 786. 787. 788. 789. 790. 791. 792. 793. 794. 795. 796. 797. 798. 799. 800. 801. 802. 803. 804. 805. 806. 807. 808. 809. 810. 811. 812. 813. 814. 815. 816. 817. 818. 819. 820. 821. 822. 823. 824. 825. 826. 827. 828. 829. 830. 831. 832. 833. 834. 835. 836. 837. 838. 839. 840. 84

- 3 -

25

1875

1894

- [10] GHENDON Y. Z., BALANDIN I. G. et BABUSHKINA L. M. (1966). — *Acta Virol.*, 10, 268.
- [11] KATO N., OHTA F. et A. OKADA (1966). — *Virology*, 28, 785.
- [12] MARCUS P. I. et SALB J. M. (1966). — *Virology*, 30, 502.
- [13] JOKLIK W. K. et MERIGNAN T. C. (1966). — *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 56, 558.
- [14] LEVY H. B. et CARTER W. A. (1968). — *J. Mol. Biol.*, 31, 561.
- [15] DIANZANI F., BUCKLER C. E. et BARON S. (1968). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 129, 535.

